

文章编号: 1001-3806(2003)06-0506-04

激光预处理种子提高大豆幼苗抗冷害的机理探讨

郭金华¹ 尹若春² 徐 剑³ 余增亮¹

(¹中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程学重点实验室, 合肥, 230031)

(²安徽大学生命科学学院生物技术系, 合肥, 230039)

(³安徽丰乐种业农业科学技术学院, 合肥, 230031)

摘要: 从能量转移、膜系统和自由基 3 个方面探讨了激光预处理大豆种子提高其幼苗抗寒性的机理。研究结果表明, 激光(He-Ne)预处理大豆种子不但明显地提高大豆种子三磷酸腺苷(ATP)的含量, 而且提高其幼苗(子叶期到第一真叶期)的抗低温胁迫的能力。处理组幼苗在 3℃~5℃低温胁迫下比对照组有较高的过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和淀粉酶(AML)的活性及可溶性蛋白质含量。同时预处理还降低了幼苗子叶中超氧阴离子(O₂⁻)含量、丙二醛(MDA)的积累量及电解质外渗率。

关键词: 激光生物学; 抗冷害机理; 激光预处理种子; ATP; 酶活性; 自由基; 膜透性; 大豆幼苗

中图分类号: Q631; S123 **文献标识码:** A

Mechanism research of soybean seedling cold acclimation through pretreatment of soybean seeds with He-Ne laser

Guo Jinhua¹, Yin Ruochun², Xu Jian³, Yu Zengliang¹

(¹Key Laboratory of Ion Beam Biengineering, Institute of Plasma Physics, CAS, Hefei, 230031)

(²Department of Biotechnology, School of Life Science, Anhui University, Hefei, 230039)

(³Anhui Fergle Agricultural Science and Technology Academy, Hefei, 230031)

Abstract: How laser pretreatment can improve soybean seedlings' cold acclimation is studied in the view of energy transformation, biomembrane integrality and oxygen free radical injury. The results show that pretreatment of soybean seeds with He-Ne laser enhance not only the seeds' content of ATP but also seedlings' cold acclimation during cotyledons to primary leaves stage. Pretreatment groups' seedlings at 3℃~5℃ temperature have much higher enzyme activities and content of catalase (CAT), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), amylase (AML) and soluble protein content than those in control. Pretreatment of soybean seeds with laser also decreases the rate of product of O₂⁻, the accumulation of MDA and the conductivity rate at low temperature.

Key words: laser biology; mechanism of cold acclimation; pretreatment seed with laser; ATP; free radical; enzymes activity; membrane permeability; soybean seedling

引 言

一些研究结果表明, 通过不同波长和类型的激光作为诱变源已培育出多种农作物新品种, 并对其诱变的机理也进行了一些报道^[1-3]。大豆为喜温植物, 若在出苗时遇到低温侵袭, 往往会造成腐烂、发芽率下降, 严重地影响生产。为此, 笔者运用 He-Ne 激光预处理大豆种子, 通过分析种子 ATP 含量及种子萌发过程中酶的活性、超氧阴离子(O₂⁻)的形成、脂质过氧化产物 MDA 的积累和膜透性的变化。动

态追踪有关活性氧清除酶的活性, 探讨不同剂量、不同的辐照时间的作用效应与抗冷害之间的关系。试图从能量转移、膜生物学及自由基生物学角度来综合分析激光的作用机制, 为激光辐照增强作物抗逆(冷害)性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 处理与材料

材料为丰豆 101 种子, 试验随机分为 5 组, 每组 3 个重复, 每重复 60 粒, 其中 4 组处理, 1 组对照。处理组接受激光辐照。He-Ne 激光器的波长为 632.8nm, 激光直射大豆种子胚, 距离为 5cm, 辐射功率密度分别为 3.8mW/mm² 和 5.4mW/mm²。每种功率密

作者简介: 郭金华, 男, 1963 年 9 月出生。副教授。从事植物诱变育种及作物生理方面的科研工作。

收稿日期: 2003-03-21; 收到修改稿日期: 2003-04-30

度的辐射时间为 60s 和 300s 两种。将对照及处理组种子置于 (25 ± 1) °C 恒温培养箱内浸种、催芽。室内培养, 待子叶伸展后移至 (3~ 5) °C 低温培养箱中, 在 1000lx 光强, 12h/d 光周期。冷胁迫的第 0, 1, 2, 3 天分别取处理组和对照组的子叶, 做酶活性分析, 可溶性蛋白质含量, 超氧阴离子(O₂^{-·}) 和丙二醛含量以及电解质外渗率的测定。

1.2 测定项目及方法

取各处理的种子 25 粒, 放入试管中, 加入 15mL 无水乙醇, 沸水浴中煮干, 加入 15mL 蒸馏水后煮沸 5min, 冷却。吸取 0.5mL 提取液与闪烁杯中, 分别加入 0.8mL 荧光素酶液, 将闪烁杯置于全自动液闪计数器上测其发光强度, 因 ATP 含量与发光强度成正比, 故可测出 ATP 的相对含量。

电解质外渗率测定参照朱广廉等的方法^[4]。可溶性蛋白含量测定参照 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 染色法^[5], 以标准牛血清白蛋白(BSA) 作标准曲线。超氧阴离子(O₂^{-·}) 含量测定参照王爱国等的方法^[6]。丙二醛(MDA) 含量测定参照 Heath 等的硫代巴比妥酸(TBA) 比色法^[7]。超氧化物歧化酶(SOD) 活性测定参照田廷亮的抑制 NBT 光化还原法^[8]。过氧化物酶(POD) 活性测定采用愈创木酚法^[4]。淀粉酶(AML) 活性采用 3, 5-二硝基水杨酸法^[4]测定。过氧化氢酶(CAT) 活性的测定采用碘量法测定^[8]。

以上所有项目的测定均重复 3 次, 最终结果取 3 次试验的平均值。

2 结果与分析

2.1 激光预处理对大豆种子 ATP 含量的影响

表 1 表明: 种子经激光处理后, ATP 含量比对照组明显提高, 其中以 3.8mW/mm², 300s 处理的增加幅度为最大, 说明一定剂量的激光可提高种子 ATP 的含量。种子 ATP 含量增加可加速种子萌发, 提高生理生化代谢过程。

Table 1 The effect of laser on ATP content of soybean seeds

treatment		ATP/ cpm	± %
CK		18840	
3.8mW/ mm ²	60s	21870	16.1
	300s	28380	50.6
5.4mW/ mm ²	60s	24760	31.4
	300s	20950	9.9

2.2 激光预处理对幼苗子叶代谢活力的影响

由图 1 知, 幼苗转入低温培养后的第 1、第 2

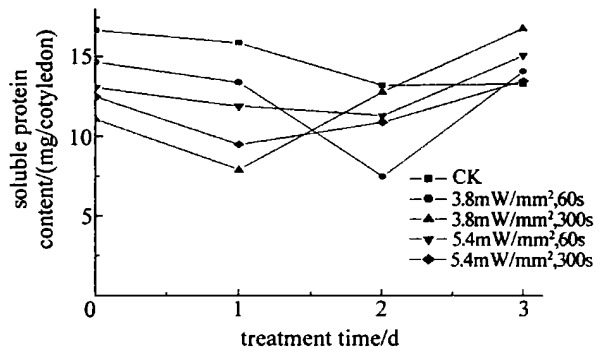


Fig. 1 Effect of HeNe laser on soluble protein content in cotyledon of soybean seedling at low temperature

天, 可溶性蛋白质含量呈下降趋势, 处理组和对照组无明显差别。随后可溶性蛋白质含量上升, 处理组上升较快。说明处理组子叶蛋白质合成恢复速度大于对照组, 幼苗适应和抵抗低温的能力增强, 这与 AML 活性相吻合(见图 2)。AML 活性高可使细胞中积累更多单糖, 使原生质浓厚, 增强抗低温冷害的能力。处理组的 AML 活性都高于对照组, 说明激光预处理可提高幼苗抗寒能力。

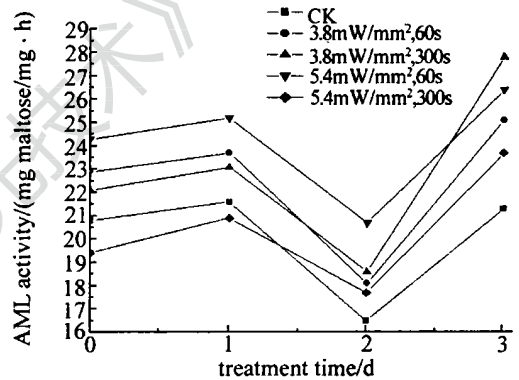


Fig. 2 Effect of HeNe laser on amylase activity in cotyledon of soybean seedling at low temperature

2.3 激光预处理对幼苗子叶生物膜的影响

由图 3、图 4 和图 5 可看出, 在幼苗受到低温胁迫的第 1 天, 各处理组的 O₂^{-·} 含量都有不同程度地

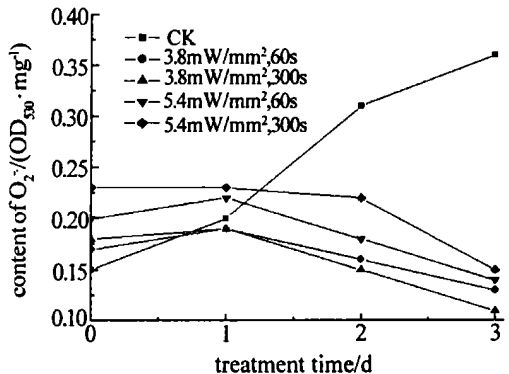


Fig. 3 Effect of HeNe laser on O₂^{-·} content in cotyledon of soybean seedling at low temperature

升高, 随后其含量直线下降, 而对照组的 O₂^{-·} 含量却一直上升。随着冷害胁迫的延长, MDA 在细胞内

积累增加, 电解质渗漏逐渐加大, 对照组的 MDA 水平明显高于处理组, 电解质外渗率又高于处理组。说明激光预处理种子影响到膜系统结构与功能的完整, 进而影响幼苗耐受低温的能力。

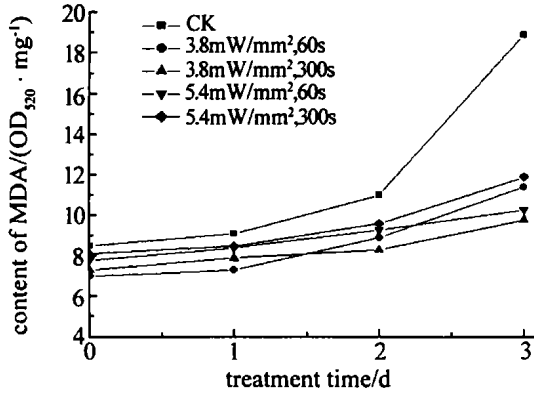


Fig. 4 Effect of He Ne laser on accumulation of malondialdehyde in cotyledon of soybean seedling at low temperature

受性较高。到了第 2、第 3 天处理组幼苗的 SOD, POD 和 CAT 活性在冷胁迫诱导下迅速增加, 上升幅度大于对照组。由于处理组幼苗内的 SOD, POD 和 CAT 3 种酶活力大大高于对照组, 这就使得其幼苗清除多余氧自由基能力加强, 增强幼苗的适应能力。

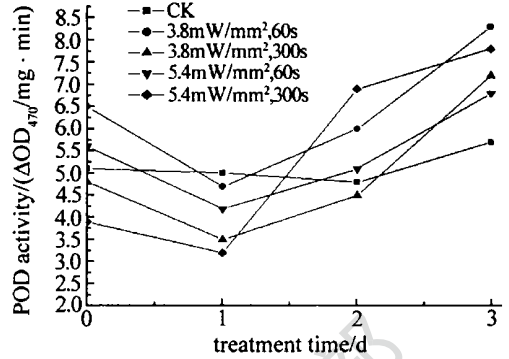


Fig. 7 Effect of He Ne laser on peroxidase activity in cotyledon of soybean seedling at low temperature

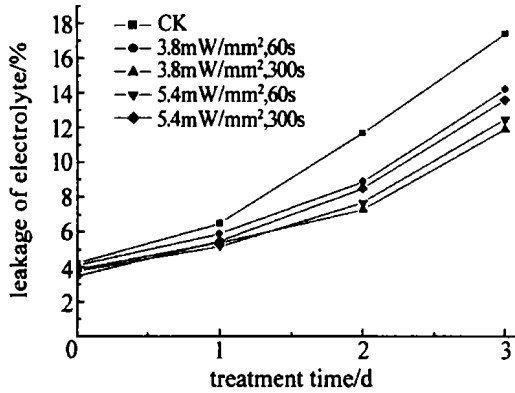


Fig. 5 Effect of He Ne laser on electrolytic leakage of cotyledon of soybean seedling at low temperature

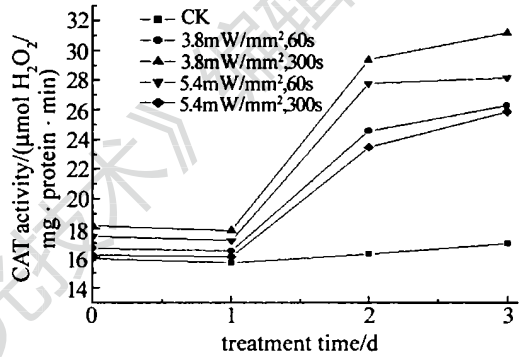


Fig. 8 Effect of He Ne laser on catalase activity in cotyledon of soybean seedling at low temperature

2.4 激光预处理对大豆幼苗子叶自由基清除酶系的影响

图 6、图 7 和图 8 表明: SOD, POD, CAT 3 种自

3 讨论

生物化学中 ATP 产生的构象偶联假说认为^[9], 由电子传递而释放的能量, 能量转移到线粒体的构象中, 当这种高能的收缩态转变成低能量的膨胀态时, 此能量可用于合成 ATP。实验结果表明: 大豆种子经激光进行预处理后, ATP 含量比对照明显增加。这可能是线粒体在激光辐照下获得能量, 将该能转移到线粒体变化中, 从而增加了 ATP 含量。同时, 由于激光的电磁场效应, 用一定剂量的激光照射植物细胞, 可在线粒体膜表面形成环形电场, 这种电场可能加快电子传递速度, 增加氧化磷酸化速度, 促进 ATP 产生, 从而提高 ATP 的含量。种子的 ATP 含量的增加对种子的活力有着积极的意义, 它可以促进种子的萌发, 加快其生理生化的进程。这可能是激光生物效应的重要原因之一。

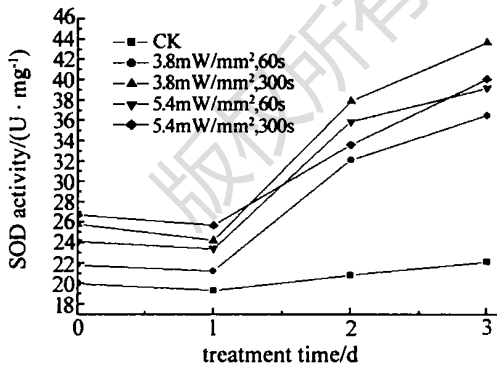


Fig. 6 Effect of He Ne laser on superoxide dismutase activity in cotyledon of soybean seedling at low temperature

由基清除酶活性在大豆幼苗突然受到低温胁迫时, 第 1 天活性都下降。处理组幼苗的 SOD, POD 和 CAT 活性下降缓慢, 而对照组的 SOD 和 CAT 活性下降迅速。说明对照组幼苗对冷胁迫敏感, 处理组耐

生物体在逆境如低温情况下, 细胞的某些代谢失调, 致使产生大量自由基, 打破了自由基代谢平

衡,从而造成对细胞的伤害。而 CAT, SOD, POD 等自由基清除酶在 $O_2^{\cdot-}$ 浓度上升时,可大量合成,从而提高清除自由基的能力。本实验结果显示:激光预处理的大豆幼苗比对照组有较高的 CAT, SOD, POD 活性,明显地提高了机体活性氧代谢水平。这就有效地减轻种子在吸水萌发呼吸速率急剧增加时在呼吸电子传递链上 NADH 黄素蛋白和辅酶 Q-Cytb 等位点因形成电子漏而促进 $O_2^{\cdot-}$ 的大量生成导致的膜系统活性氧损伤^[10],进而增强幼苗生长的活力。

研究中还发现,处理组 AML 活力明显高于对照组,MDA 和电解质外渗率低于对照组。MDA 和电解质外渗率低说明膜脂过氧化程度低,膜受到的损伤小。AML 活力的提高有助于生物膜结构的完整,使得膜功能更加完善,为提高代谢酶系及保护酶系的活力奠定了物质基础。

(上接第 502 页)

带增宽,且由于回火区硬度随着回火带宽增大而逐渐降低,以至于产生不能满足实用要求的软化带。通过多次试验,得出 50[#] 钢模切辊激光表面淬火的最佳工艺参数是:激光功率 2.0kW、扫描速度 12mm/s、离焦量 50mm、搭接率 20%左右。图 6 是 50[#] 钢模切辊激光表面淬火的照片。

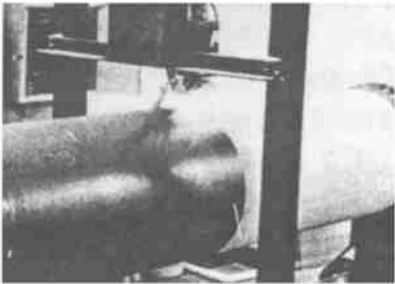


Fig. 6 Laser surface hardening for mould cutting roller of 50 carbon steel

3 结 论

(1) 在适当的工艺参数下,对 50[#] 钢模切辊进行

综上所述,从能量转移、膜系统和自由基伤害方面来解释激光预处理大豆种子的后生物效应:种子内 ATP 含量提高,加速了种子的萌发,提高了酶的活性,而膜结构功能的完整为酶活性调节的提供了物质基础。酶活性的提高,使得清除自由基能力增强,最终表现出幼苗的耐寒性提高。

参 考 文 献

- [1] 许梅芬. 应用激光, 1995, 15(3): 131~ 134.
- [2] 黄光明, 刘承宜, 刘松豪. 激光生物学报, 1998, 7(2): 90~ 92.
- [3] 吴俊林. 应用激光, 2001, 21(3): 191~ 192.
- [4] 朱广廉, 钟诲文, 张爱琴. 植物生理学实验. 北京: 科学出版社, 1990: 252~ 253, 37~ 39, 175~ 178.
- [5] Bradford M M. Plant Physical, 1991, 95: 648.
- [6] 王爱国, 罗广华. 植物生理学通讯, 1990(6): 55~ 57.
- [7] Heath R L, Packer L. Arch Biochem Biophys, 1968, 125: 189~ 198.
- [8] 田廷亮, 扶惠华. 植物生长物质及其应用. 北京: 科学技术文献出版社, 1995: 291~ 296.
- [9] 沈 同. 生物化学. 北京: 人民教育出版社, 1981: 440.
- [10] Rich P R, Bonner W D. Biochem Biophys, 1978, 188: 200~ 213.

激光淬火,工件变形很小,完全可以满足实用需要。

(2) 50[#] 钢模切辊经激光表面淬火后,硬化层组织由细小的位错马氏体和隐晶马氏体及少量的残余奥氏体组成,组织细密,硬度高,整体的硬度分布比较均匀。

参 考 文 献

- [1] 潘 邻, 陶锡麒, 夏春怀 *et al.* 金属热处理, 2002, 27(1): 18~ 20.
- [2] 邹相军, 樊湘芳, 石世宏 *et al.* 激光技术, 2002, 26(1): 68~ 70.
- [3] 花银群, 陈瑞芳. 机械设计与制造工程, 2001, 30(1): 55~ 56.
- [4] 马自忠. 金属热处理, 1999, 24(8): 5~ 7.
- [5] 林剑东, 郑会军, 李大东 *et al.* 钢铁钒钛, 1998, 19(4): 31~ 35.
- [6] 王存山, 关振中, 石 岩 *et al.* 应用激光, 1998, 18(4): 148~ 150, 160.
- [7] 袁 斌, 龚知本, 沈书泊 *et al.* 激光技术, 1999, 23(6): 364~ 368.
- [8] 王家金. 激光加工技术. 北京: 中国计量出版社, 1992: 189~ 209.